

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARIA EDUARDA TABAREZ DE ABREU

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E O PERFIL ELETROFORÉTICO DO
VENENO DE *Bothrops pubescens***

**São Gabriel
2018**

MARIA EDUARDA TABAREZ DE ABREU

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E O PERFIL ELETROFORÉTICO DO
VENENO DE *Bothrops pubescens***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Biotecnologia da Universidade
Federal do Pampa, como requisito
parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Paulo Marcus Pinto

Coorientador: M. Sc. Darlene Lopes Rangel

**São Gabriel
2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

A616a Abreu, Maria Eduarda Tabarez
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E O PERFIL ELETROFORÉTICO DO VENENO
DE *Bothrops pubescens* / Maria Eduarda Tabarez Abreu.
43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação) -- Universidade
Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2018.
"Orientação: Paulo Marcos Pinto".

1. Venenos de serpentes . 2. Análise de toxicidade . 3.
Perfil eletroforético. I. Título.

MARIA EDUARDA TABAREZ DE ABREU

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E O PERFIL ELETROFORÉTICO DO
VENENO DE *Bothrops pubescens***

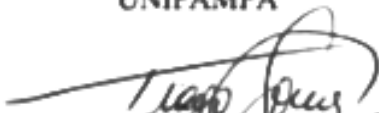
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 07 de dezembro de 2018.

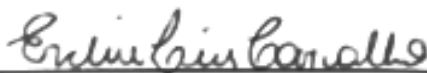
Banca examinadora:



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Tiago Gomes dos Santos
UNIPAMPA



M.Sc. Evelise Leis Carvalho
UNIPAMPA

DEDICATÓRIAS

Em primeiro lugar, dedico este trabalho a mulher mais incrível e forte que conheço: minha mãe. Além do suporte financeiro para a realização de um sonho, também me amparou emocionalmente em todos os momentos difíceis que enfrentei no decorrer desta caminhada.

Dedico a todos da minha família que se fizeram presente de alguma maneira nesta caminhada e dedico também aos meus amigos que torceram e foram de suma importância para a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Patricia Ereias, por todo o comprometimento com meus estudos e por sempre se dedicar a dar o melhor para nossa família e, ao meu irmão João Rodrigo, pela parceria de sempre. Sem vocês dois nada disso teria valido a pena. Também agradeço ao meu pai Lincon Rodrigo, por sempre me amparar e me incentivar. Graças a vocês eu pude, além de me formar em uma faculdade, me tornar a mulher que sou hoje.

Agradeço a minhas avós Sherley Tabarez, Helena Azambuja e Liane Abreu que, apesar da distância e das dificuldades nunca mediram esforços para me ajudar, de uma maneira ou de outra, a traçar esta jornada.

Agradeço ao meu orientador Paulo Marcos por ter me acolhido do LPA e por todas as oportunidades, conselhos, ensinamentos, teorias sobre buracos negros e por me incentivar (da sua maneira). O senhor fez parte da minha formação e sou muito grata por ter aceitado ser meu orientador. Agradeço também a minha coorientadora e amiga Darlene Rangel por todos os ensinamentos, parceria e cervejas antes das provas de Biotecnologia Microbiana.

Aos professores da UNIPAMPA agradeço por todos os anos de ensinamento e amizade. Apesar da carreira de professor não ser nada fácil cada um de vocês contribuiu, com excelência, na formação de todos nós. Em especial, ao professor Juliano que, além das cadeiras mais difíceis e as piores provas, sempre foi um professor sensacional e um grande amigo.

Aos meus grandes amigos do TIME dedico meu muito obrigado. Vocês são demais (já que não posso falar palavrão aqui). Aliviaram as dificuldades da graduação com muita amizade e bebida e eu nem sei explicar a saudade que vou sentir de cada um de vocês.

A Cynthia, que eu nem sei se é minha amiga, minha irmã ou simplesmente minha alma gêmea. Obrigada por todos os porres, ombro para chorar, conselhos e correção deste trabalho. Não tenho palavras para nossa amizade.

Agradeço também a UNIPAMPA pela oportunidade de cursar uma graduação, amparo financeiro e experiência adquirida.

A banca examinadora fica meu muito obrigado, pela disponibilidade de ler e contribuir com meu trabalho.

“Passamos toda a vida nos preocupando com o futuro. Fazendo planos para o futuro. Tentando prever o futuro. Como se desvendá-lo fosse aliviar o impacto. Mas o futuro está sempre mudando. O futuro é o lar dos nossos medos mais profundos e das nossas maiores esperanças. Mas uma coisa é certa: quando ele finalmente se revela, o futuro nunca é como imaginamos.”

Meredith Grey

RESUMO

No Brasil ocorrem 405 espécies de serpentes, das quais apenas duas famílias são peçonhentas, dentre elas, a principal é a família Viperidae, compreendida pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*. O gênero *Bothrops* compreende espécies de serpentes de maior interesse médico, devido ao grande número de acidentes que ocorrem envolvendo estes animais. A composição do veneno do gênero *Bothrops* já é conhecido através de técnicas como venômica e já foi elucidado em diversos estudos a grande variabilidade na composição proteica de seu veneno devido a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. *Bothrops pubescens* é uma serpente peçonhenta endêmica da região do bioma Pampa e, até recentemente, era considerada uma subespécie de *B. neuwiedi*, mas foi elevada a categoria de espécie em 2004. Tendo em vista a existência de variação na composição do veneno entre serpentes do gênero *Bothrops* e a ocorrência restrita de *B. pubescens* aliado a recente elevação taxonômica, carecendo de estudos que elucidem a composição de seu veneno, esse trabalho objetivou testar o potencial tóxico do veneno e caracterizar seu perfil proteico através de técnicas eletroforéticas, buscando encontrar semelhanças e diferenças em sua composição. A metodologia aplicada neste trabalho partiu da extração do veneno através de massagem da glândula de veneno e aplicação de pressão das presas contra um béquer. Concentrações de 70, 140 e 280 µg/mL foram expostas em preparações de músculo biventer cervicis de pintainhos (*Gallus galus domesticus*). Para as análises proteômicas, 17 µg de proteína foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Os resultados da análise de toxicidade na força de contração do músculo biventer cervicis mostraram um bloqueio total na concentração de 280 µg/mL após 120 minutos de exposição e um bloqueio parcial de 40% nas demais concentrações após os mesmos 120 minutos. Através do gel de poliacrilamida, foi possível observar bandas entre 23 e 100kDa, sendo as bandas de 23 kDa proeminentes no gel. Concluiu-se com este trabalho que o veneno de *B. pubescens* causa um bloqueio total da força de contratura muscular na concentração de 280 µg/mL após 120 minutos de exposição em preparações de músculo biventer cervicis de pintainhos na temperatura de 37°C. Também foi possível observar neste trabalho diferenças no perfil proteico do veneno de *B. pubescens* em relação a outras serpentes do mesmo gênero.

Palavras chave: Biventer cervicis, análises proteômicas, serpentes botrópicas, veneno.

ABSTRACT

Brazil houses 405 species of snakes, of which only two families are venomous, among them, the main one is the Viperidae family, that comprises the genera *Crotalus*, *Lachesis* and *Bothrops*. The genus *Bothrops* comprises snakes species of greater medical interest, due to the large number of accidents that occur involving these animals. The composition of the venom is already known through techniques as venomic and has already been elucidated in several studies the great variability in the protein composition of its venom due to several intrinsic and extrinsic factors. *Bothrops pubescens* is a venomous snake of the genus *Bothrops*, endemic to the Pampa biome and, until recently, was considered a subspecies of *B. neuwiedi*, but the species category was elevated in 2004. Thus, the variation in the composition of the venom between the two species *Bothrops* and the restricted occurrence of the *B. pubescens* species together with recent classification as a species, lacking studies that elucidate the composition of its venom, this work aimed to test the toxic potential of the venom and to characterize its protein profile through electrophoretic techniques, seeking to find similarities and differences in their composition. The methodology applied in this work started from the extraction of venom through massage of the venom gland and application of pressure of the prey against a beaker. Concentrations of 70, 140 and 280 $\mu\text{g} / \text{mL}$ were exposed in preparations of biventer cervicis chicks (*Gallus galus domesticus*). For the proteomic analyzes, 17 μg of protein were subjected to a denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The results of the toxicity analysis on the contraction force of the biventer cervicis muscle showed a total block at the concentration of 280 $\mu\text{g} / \text{mL}$ after 120 minutes of exposure and a 40% partial block at the other concentrations after the same 120 minutes. Through polyacrylamide gel it was possible to observe bands between 23 and 100 kDa, the bands of 23 kDa being prominent in the gel. It was concluded with this work that *B. pubescens* venom causes a total blockage of muscle contraction force at the concentration of 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 120 minutes of exposure in preparations of biventer cervicis chicks at 37 °C. It was also possible to observe differences in the protein profile of *B. pubescens* venom in relation to other snakes of the same genus.

Keywords: Biventer cervicis, proteomic analyzes, botrópicas snakes, venom.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Tipos de dentição das serpentes peçonhentas. Dentição Proteóglifa (A) e Dentição Solenóglifa (B).....16
- Figura 2 - Imagem da cabeça de uma jararaca (*Bothrops jararaca*) que destaca a fosseta loreal, estrutura característica das serpentes peçonhentas.....17
- Figura 3 - Exemplar de *B. pubescens*. (A) Exemplar coletado em Santa Margarida do Sul, Rio Grande do Sul (Foto de Paulo Jr. Godinho); (B) Distribuição Geográfica da espécie *B. pubescens* (Silva, 2004); (C) Padrão de Manchas da espécie da espécie *B. pubescens* por Silva, 2004.....19
- Figura 4 - Mapa da localidade de coleta do espécime de *B. pubescens* na cidade de Santa Margarida do Sul, Rio Grande do Sul.....24
- Figura 5 - Método de extração manual de veneno de serpentes realizado no Laboratório de Estudos em Biodiversidade Pampiana (LEBIP) da Fundação Universidade Federal do Pampa. Na imagem pode-se observar a realização da massagem nas glândulas de veneno e a pressão contrária exercida pelo bécquer nas presas para a saída do veneno. (Foto de Darlene Rangel).....25
- Figura 6 - Fotografia da preparação do músculo biventer cervicis de pintainho (*G. gallus domesticus*) para posterior exposição ao veneno de *B. pubescens* em banho de órgão isolado.....26
- Figura 7 - Efeito das concentrações de 70, 140 e 280 µg/mL do veneno de *B. pubescens* em preparação de músculo biventer cervicis de pintainho a 37°C. O gráfico mostra a curva de resposta à concentração-tempo para atividade de bloqueio neuromuscular do veneno em comparação ao controle.....28
- Figura 8 - Perfil eletroforético do veneno de *B. pubescens*. (A) marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscop Prestained Protein Standards da BioRad; (B) veneno de *B. pubescens*; (C) marcador de peso molecular SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range da Bio-Rad.....29
- Figura 9 – Comparação do perfil eletroforético do veneno de serpentes botrópicas. (A) Veneno de *B. jararaca*, canaleta 1 serpentes do cativeiro; canaleta 2 serpentes utilizadas

para fabricação do soro antiofídico e canaleta 3 mistura das duas peçonhas; (B) = canaleta 1 (AUR) *B. aurifer*; canaleta 2 (LAT) *B. lateralis*; canaleta 3 (MAR) *B. marchi*; canaleta 4 (SCH) *B. schlegelli*; canaleta 5 (BIL) *B. bilineata*; canaleta 6 (TAN) *B. taeniata*; canaleta 7 (ASP) *B. asper*; canaleta 9 (NEU) *B. newwiedi bolivianu*; (C) = canaleta 1 (JAR) *B. jararaca*; canaleta 2 (NEU) *B. newwiedi*; canaleta 3 (ATR) *B. atrox*; canaleta 4 (JSU) *B. jararacuçu*; canaleta 5 (ALT) *R. alternatus*; canaleta 6 (COT) *R. cotiara*; (D) = venenos de *B. jararaca* em diferentes estágios de desenvolvimento; canaleta 1 fêmeas adultas; canaleta 2 machos adultos; canaleta 3 pool de veneno de serpentes adultas; canaleta 4 pool de veneno de serpentes recém nascidas.....31

LISTA DE ABREVIATURAS

CIT – RS - Centro de Informação Toxicológica do estado do Rio Grande do Sul;

SDS – PAGE - Gel de poliacrilamida desnaturante;

SAB – Soro antibotrópico;

LEBP – Laboratório de Estudos em Biodiversidade Pampiana;

BC – Biventer cervicis;

NaCl – Cloreto de sódio;

CaCl₂ – Cloreto de cálcio;

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio;

MgSO₄ – Sulfato de magnésio;

KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico;

O₂ – Oxigênio;

CO₂ – Carbono;

μM – Micrometro;

mM – Micro molar;

ACh – Acetilcolina;

KCl – Cloreto de Potássio;

μg/mL – Microgramas por milímetro;

nm – Nanômetros;

μg – Microgramas;

SDS – Dodecil sulfato de sódio;

SVMP – Metaloproteínases de venenos de serpentes;

JNM – Junção neuromuscular;

MMPs – Matriz extracelular de mamíferos;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

LNC – Lista de Notificação Compulsória de Agravos a Saúde;

SUS – Sistema Único de Saúde.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Serpentes peçonhentas no Brasil.....	15
1.2. Gênero <i>Bothrops</i>	17
1.3. Variabilidade na ação e composição do veneno de serpentes botrópicas.....	19
1.4. Ação sistêmica e local induzida pelo veneno de <i>B. pubescens</i>	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. Extração de veneno.....	24
3.2. Manutenção de <i>Gallus gallus domesticus</i>	25
3.3. Técnica miográfica.....	25
3.3.1. Preparação músculo biventer cervicis (BC) de pintainho e exposição ao veneno de <i>B. pubescens</i>	25
3.3.2. Análises estatísticas.....	26
3.4. Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	27
3.5. Comparação de perfis eletroforéticos de venenos botrópicos.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Efeito do veneno de <i>B. pubescens</i> sobre a junção neuromuscular em preparação biventer cervicis de pintainho.....	28
4.2. Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	29
4.3. Comparação do perfil proteico do veneno de <i>B. pubescens</i> com outras serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	29
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
7. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes peçonhentas no Brasil

A ordem Squamata, grupo monofilético formado principalmente por lagartos, serpentes e anfisbenas, é composto por, aproximadamente, 8.430 espécies, representando o maior componente da diversidade de vertebrados terrestres do mundo. As serpentes, subordem compreendida por cerca de 3.150 espécies, divididas em 24 famílias (HEDGES; VIDAL, 2009; OGUIURA *et al* 2010; UETZ, 2018) são animais de corpo alongado com ausência de apêndices locomotores, pálpebras móveis e ouvido externo (UNDERWOOD, 1967) as quais habitam praticamente todo o mundo, excluindo as calotas Polares (FRANCO, 2009). O território brasileiro possui uma fauna muito rica, totalizando cerca de 405 espécies de serpentes (COSTA; BÉRNILS, 2018). Contudo, dentre toda essa diversidade, apenas duas famílias são conhecidas como peçonhentas: Elapidae e Viperidae (ÁRAUJO, 2003).

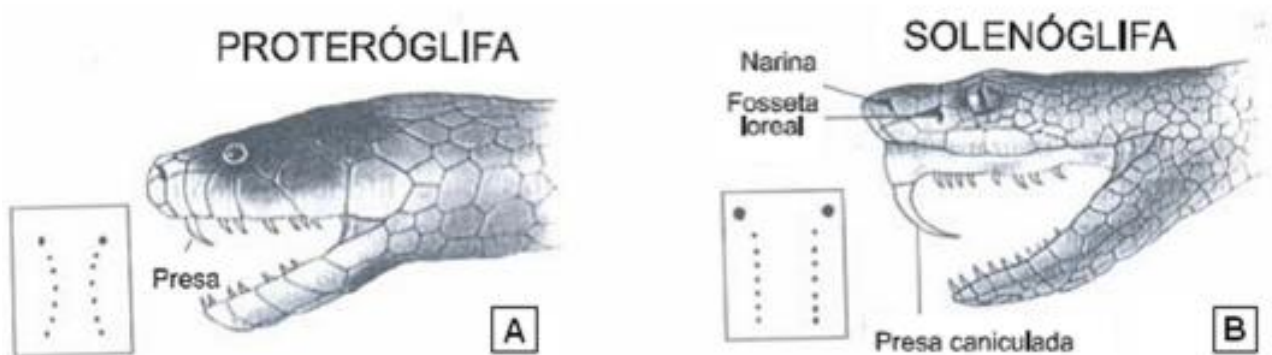
As serpentes conhecidas como corais, gênero *Micrurus*, são as representantes Elapidae nas Américas e possuem dentição do tipo proteróglifa, ou seja, apresentam dois dentes fixos inoculadores de peçonha na parte anterior do maxilar superior que estão conectadas às glândulas de veneno (Figura 1 A) (MELGAREJO, 2009). Devido às limitações anatômicas, funcionais e hábito de vida fossorial observados nos representantes dessa família (associado também a pouca agressividade) os acidentes ofídicos envolvendo essas serpentes são de baixa incidência, em torno de 1%, segundo dados do Ministério da Saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Já a família Viperidae, que contém os representantes de maior importância médica devido à sua ampla distribuição geográfica, hábitos terrestres e arborícola, que aumentam as chances de encontro com o homem e, à sua agressividade relacionada ao modo de caça predatório baseado em botes de presas relativamente grandes, tornam-se responsáveis pelo maior número de acidentes envolvendo animais de estimação e seres humanos (WARREL, 2004). A família Viperidae é compreendida pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*, serpentes que apresentam dentição solenóglifa caracterizada pela presença de dois dentes grandes que se projetam para fora no momento da inoculação da peçonha (ALVES, 2007; COSTA, BÉRNILS, 2014) (Figura 1 B). Dentre os representantes da família Viperidae o gênero *Bothrops* é o responsável pelo maior número de acidentes registrados, representando no ano de 2015, no total de 24.467 acidentes, 86,7%. Cerca

de 8,6% tem como responsáveis as serpentes do gênero *Crotalus*, e os gêneros *Lachesis* e *Micrurus* representam taxas inferiores a 5%, segundo dados registrados pelo Ministério da Saúde.

O envenenamento por picada de cobra é um problema de saúde pública mundial, incluído no portfólio de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e o ofidismo foi incluso na Lista de Notificação Compulsória de Agravos a Saúde (LNC/SUS), publicada na portaria nº 2.472 de 31 de agosto de 2010, devido ao alto número de ocorrências (SOUZA, 2010). A gravidade do ofidismo se deve ao efeito resultante das ações de enzimas e toxinas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995) presentes neste veneno, exercendo diferentes atividades sob o sistema nervoso, cardiovascular, locomotor e ainda atuando na coagulação do sangue e na permeabilidade das membranas (KARLSSON; LEE, 1979).

O principal foco de diversos estudos envolvendo serpentes é seu veneno, se dedicando a compreender a relação, estrutura e função de seus componentes bioativos e visando sua aplicabilidade nas áreas clínicas e biotecnológica (RAMOS; SELISTE DE ARAUJO, 2006), mas pouco se sabe ainda sobre a composição desta peçonha. As principais funções destas toxinas são causar paralisia e morte na presa, além de auxiliar na digestão. Porém, dentre as atribuições adquiridas ao decorrer da evolução estão também proteção contra possíveis predadores, pois, quando em contato com o organismo, causa uma resposta farmacológica instantânea podendo levar seu inimigo à morte em poucos segundos (MURARI *et al.*, 2005).

Figura 1- Tipos de dentição das serpentes peçonhentas. Dentição Proteóglifa (A) e Dentição Solenóglifa (B).



Fonte: <http://petsebichosbr.blogspot.com/2013/01/exoticas-e-poderosas-assim-sao-as-cobras.html>.

1.2. Gênero *Bothrops*

O nome *Bothrops* (WAGLER, 1824) vem da língua Grega, onde “*Bothros*” significa fosseta ou cavidade e “*ops*” significa olho ou face, fazendo alusão à fosseta loreal, localizada entre a narina e os olhos de serpentes peçonhentas (CARRASCO *et al*, 2012) (Figura 2).

Os representantes do gênero *Bothrops* compreendem cerca de 28 espécies (COSTA; BÉRNILS, 2018) que apresentam grande variação de características morfológicas e ecológicas, porém de forma geral, possuem cauda lisa e sem chocalho (CUPO *et al*, 1990). Ocupam os mais variados ambientes, desde florestas úmidas a regiões semiáridas (MELGAREJO, 2009), sendo os extremos representados no sul do México por *B. asper* e por *B. ammodytoides* na Patagônia, Argentina (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Os representantes do gênero mostram uma grande diversidade de tamanho, variando entre 30 cm (*B. itapetiningae*) a 180 cm (*B. asper*). Dentre as espécies de maior relevância para a saúde pública destacam-se *B. alternatus* (cruzeira), *B. jararaca* (jararaca), *B. jararacussu* (jararacuçu), *B. neuwiedi* (MELGAREJO, 2009).

Figura 2 – Imagem da cabeça de uma jararaca (*Bothrops jararaca*) que destaca a fosseta loreal, estrutura característica da maioria das serpentes peçonhentas.



Fonte: <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/6594>.

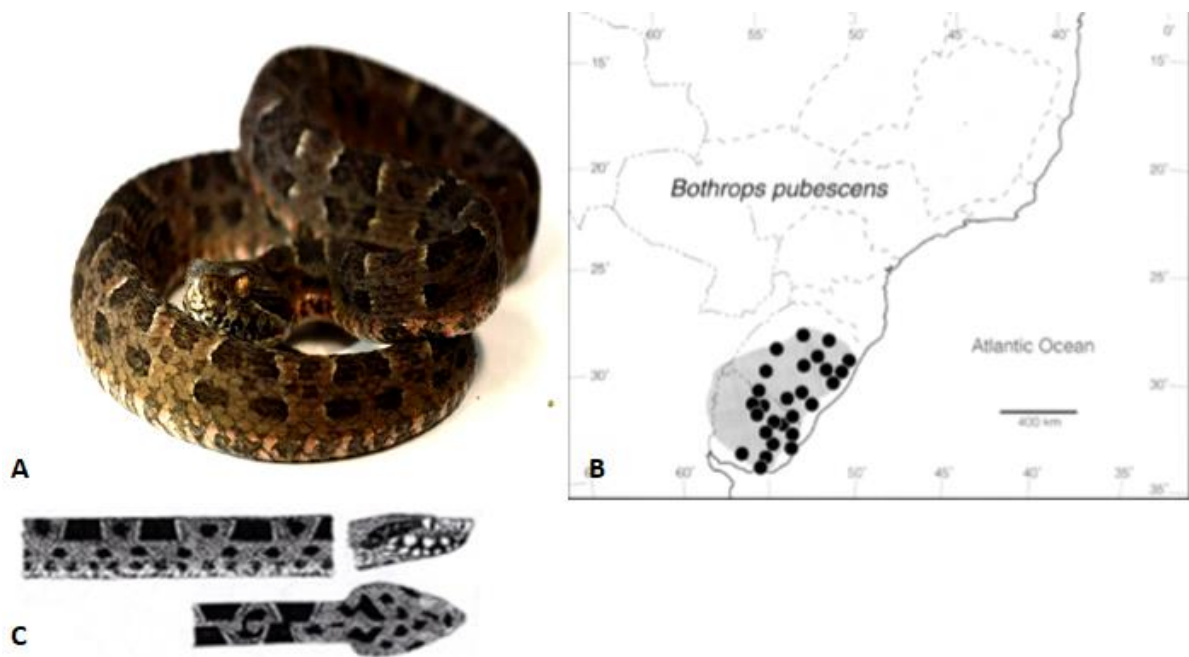
Com o avanço nos estudos genéticos e maior exploração da composição do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* observou-se que alguns exemplares considerados como subespécie, diferiam para elevação ao nível de espécie. Como

exemplo *B. pubescens*, era uma subespécie do complexo *neuwiedi*, que abrangia mais 12 espécies do gênero, das quais muitas foram elevadas à categoria específica por Silva (2004).

A serpente *B. pubescens* (Figura 3 A e C) possui hábitos terrestres e quando adulta geralmente supera 1 metro de comprimento total (SILVA, 2004). Sua distribuição geográfica é restrita, ocorrendo apenas na metade sul do Rio Grande do Sul, onde predomina o bioma Pampa, e em todo território Uruguaio (Figura 3 B). Não existem registros desta espécie no litoral externo da Lagoa dos Patos e nem para o Litoral Norte do Rio Grande do Sul ao sul de Osório (SILVA, 2004), o que a torna uma espécie endêmica do bioma Pampa. Almeida (1999) estudou a dieta da espécie e observou que consiste em lacraias, anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos e aves e que há variação ontogenética na dieta, já que indivíduos pequenos alimentam-se principalmente de anfíbios e não consomem mamíferos, enquanto que indivíduos de tamanho mediano predam sobre todas as categorias de presa e indivíduos grandes consomem exclusivamente mamíferos.

De julho de 2010 a julho de 2013, o Centro de Informação Toxicológica do estado do Rio Grande do Sul (CIT –RS) atendeu 2.953 casos de ofidismo botrópico ocorridos no estado. E em 115 casos ocorreu a identificação da espécie envolvida, através do envio de imagens dos animais por meio de aparelhos eletrônicos. Dos casos em que ocorreu a identificação da espécie, 33 (29%) foram identificados *B. jararaca* como responsável, 12 (10%) *B. alternatus* e 3 (3%) *B. cotiara*. 67 (58%) dos acidentes foram atribuídos a *B. pubescens* (SILVA *et al.*; 2013). Contudo, *B. pubescens* foi recentemente considerada uma espécie e isso traz uma problemática na identificação e atribuição desta como responsável pelos acidentes ofídicos na região do Pampa, agregado a falta de conhecimento popular da nova espécie e sua grande semelhança morfológica com outras espécies do gênero *Bothrops*, fazendo com que as taxas de acidentes possam não estar relatando a realidade.

Figura 3: Exemplar de *B. pubescens*. (A) Exemplar coletado em Santa Margarida do Sul, Rio Grande do Sul (Foto de Paulo Jr. Godinho); (B) Distribuição Geográfica da espécie *B. pubescens* (Silva, 2004); (C) Padrão de manchas em *B. pubescens* (Silva, 2004).



Fonte: O autor; Silva, 2004.

1.3. Variabilidade na ação e composição do veneno de serpentes botrópicas

Vários estudos realizados com venenos de serpentes do gênero *Bothrops* mostram a existência de variação na composição do veneno e atividades biológicas (QUEIROZ *et al.*, 2008), podendo esta variação ser, além do nível de famílias, gêneros, espécies e subespécies diferentes, mas também dentro de uma única espécie (CHIPAUX *et al.*, 1991), em nível ontogenético (LÓPEZ-LOZANO *et al.*, 2002, ANTUNES *et al.*, 2010), de variação sexual (MENEZES 2006), ou localização geográfica (ALAPE-GIRO *et al.*, 2008). Muitos estudos também argumentam que fatores ambientais como a dieta podem influenciar a composição do veneno de serpentes (DALTRY *et al.*, 1996).

A utilização de soros antiofídicos específicos constitui o principal tratamento dos envenenamentos por picada de cobra (JORGE; RIBEIRO 1997). O tratamento é muito eficiente quando pensamos na neutralização das manifestações sistêmicas, porém, a grande problemática se encontra na neutralização dos efeitos locais, pois, há uma

rápida instalação desses no organismo, anterior à administração do soro, levando às consequências tais como amputações e diversos tipos de sequelas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Outra grande questão é a variabilidade existente tanto em nível de família e até dentro de uma mesma espécie, e isso gera um quebra-cabeça para a produção do soro, já que existe uma gama proteica na composição do veneno a obter o antígeno (SILVA, 2013).

Para assegurar que o soro apresentará resposta a esta ampla diversidade, os animais imunizados recebem uma mistura de venenos de vários exemplares diferentes da mesma espécie de serpente ou do mesmo gênero (GUTIÉRREZ *et al.*, 1991). Por exemplo, a produção do SAB, soro específico para acidentes com picadas de serpentes do gênero *Bothrops* (produzido no Instituto Butantan) contém a seguinte mistura: 50% de veneno de *B. jararaca*; 12,5% *B. newiedi*; 12,5% *B. alternatus*; 12,5% *B. moojeni*; 12,5% *B. jararacussu* (SOUSA, 2013). Assim, venenos de serpentes de importância médica nas regiões Norte e Sul, *B. atrox* e *B. pubescens*, respectivamente, não estão incluídos na produção do soro antiofídico, fazendo com o que o SAB possa ser insuficiente para acidentes com essas espécies graças à falta de antígenos que seriam produzidos pelas proteínas específicas de cada espécie.

1.4. Ação sistêmica e local induzida pelo veneno de *B. pubescens*

Sabe-se que os venenos de serpentes contêm uma complexa mistura de componentes que induzem uma série de manifestações clínicas nos envenenamentos humanos. Os venenos botrópicos caracterizam-se por manifestações clínicas locais (como edema, equimose e necrose) e manifestações sistêmicas (como hemorragias, choque e insuficiência renal) (FRANÇA *et al.*, 2009).

São descritas quatro principais atividades fisiopatológicas do veneno botrópico: 1 – vasculotóxica, que é uma atividade inflamatória aguda causada por um conjunto de frações do veneno botrópico responsáveis pelos fenômenos locais, por exemplo, as proteínas como fosfolipases A2, uma enzima proteolítica responsável pela necrose tecidual ocorrida na picada e, a ação vasculotóxica sistêmica, causada por fatores hemorrágicos chamados de hemorraginas que atuam sobre os vasos sanguíneos destruindo a membrana basal e causando uma ruptura vascular (BARRAVIEIRA; PEREIRA, 1999; DALLEGRAVE; SEBEN, 2008; QUEIROZ *et al.*, 1985); 2 - ação coagulante, devido à presença de fatores de coagulação que consomem o fibrinogênio e

formam fibrina intravascular (FRANÇA *et al.*; 2009); 3 - ação hemorrágica, atribuída às hemorraginas presentes no veneno (OLIVEIRA *et al.*; 2010); 4 - ação nefrotóxica, pois, o envenenamento sistêmico causa deposição intraglomerular de fibrina que contribui com a evolução de necrose tubular por interrupção do suprimento de sangue e, além disso, a presença de microcoágulos na microcirculação gera isquemia renal (DALLEGRAVE; SEBEN, 2008).

Todas essas respostas locais e sistêmicas geradas em um envenenamento por serpentes botrópicas devem-se a grande diversidade de componentes do veneno, principalmente proteicos, que possuem ações proteolítica devido à presença de proteases, fosfolipases, hialuronidasas, (FAN; FRANÇA, 1992) e ação neurotóxica devido à presença de neurotoxinas que agem sobre a junção neuromuscular promovendo hipotonia muscular, paralisia flácida dos músculos da face, pescoço, tronco, laringe, faringe, e músculos dos membros, descrito em casos clínicos. Embora a neurotoxicidade não seja uma característica comum do envenenamento botrópico, alguns estudos realizados mostraram que os venenos de algumas espécies de *Bothrops* como *B. jararacussu*, *B. neuwiedi pauloensis*, *B. moojeni*, quando testados em preparações de aves e mamíferos, exibem ação bloqueadora da junção neuromuscular (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983; HELUANY *et al.*, 1992; RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1990; PRIANTI *et al.*, 2003; LÔBO-ARAÚJO *et al.*, 2002; BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; COGO *et al.*, 1998).

Em vítimas de envenenamento causado por *B. pubescens* são caracterizados efeitos locais, incluindo hemorragia, edema, dor e mionecrose, assim como efeitos sistêmicos como coagulopatias e falha renal (CAVALCANTE *et al.*, 2011). O primeiro sinal clínico do acidente botrópico a se manifestar é o edema intenso no local da picada, apresentando uma tonalidade violácea, consequência do sangramento subcutâneo (FRANÇA *et al.*; 2009).

Existem vários motivos para estudar e pesquisar venenos de serpentes, como o isolamento de uma ou mais substâncias ativas no veneno que, em baixas concentrações, podem apresentar grandes efeitos farmacológicos de interesse para a pesquisa de medicamentos e tratamentos; melhor compreensão da função das substâncias do veneno no envenenamento e verificar a existência de algum princípio ativo que possa inibir a ação do veneno e, de algumas proteínas isoladas do mesmo para diminuir as consequências de uma picada (TICLI, 2006). Como já elucidado por diversos autores, a

variação na composição do veneno entre serpentes do gênero *Bothrops* e a elevação de *B. pubescens* em nível de espécie, aliado à sua distribuição geográfica restrita a região do Pampa e Uruguai, trazem consequências como à falta de estudos focando na composição de seu veneno e na resposta biológica causada quando em contato com um organismo que levam a casos clínicos graves. Desse modo, torna-se importante o estudo das atividades biológicas e composição proteica do veneno de *B. pubescens* para verificar a existência de variabilidade, o que poderá contribuir para a produção de soros antiofídicos mais eficazes para os casos de acidentes além de uma nova gama de moléculas a serem descobertas e exploradas pelo escopo médico-científico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a toxicidade do veneno de *B. pubescens*, serpente endêmica da região do bioma Pampa elevada à categoria taxonômica de espécie, bem como analisar seu perfil eletroforético em comparação com a composição proteica do veneno de outras espécies de serpentes botrópicas.

2.2. Objetivos específicos

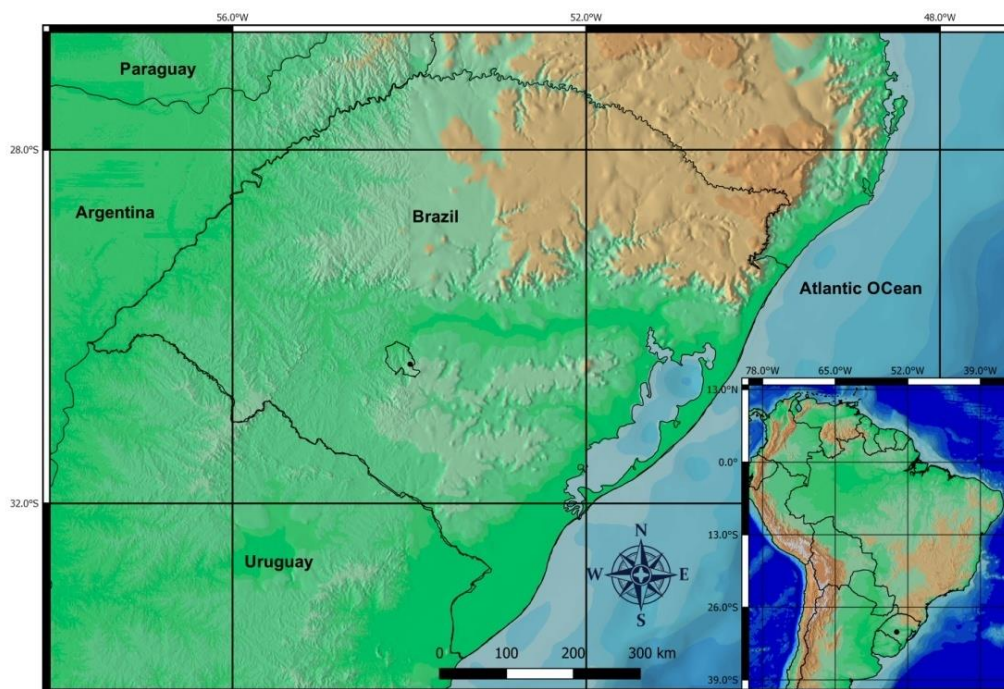
- Avaliar a toxicidade do veneno *in vitro* sobre preparações neuromusculares de ave (biventer cervicis de pintainho);
- Elucidar o perfil eletroforético do veneno da serpente *B. pubescens*;
- Comparar perfis eletroforéticos de serpentes do gênero *Bothrops*.

3. METODOLOGIA

3.1. Extração do veneno

O veneno de serpente *B. pubescens* foi fornecido pelo Laboratório de Estudos em Biodiversidade Pampiana (LEBIP) da Universidade Federal do Pampa, campus São Gabriel, pelo Professor Dr. Tiago Gomes dos Santos. A coleta foi realizada no dia 24 de outubro de 2017 na cidade de Santa Margarida do Sul, Rio Grande do Sul, localidade da Serrinha ($30^{\circ}25'46.99''\text{S}$ e $54^{\circ}0'2.80''\text{O}$) da qual uma fêmea adulta foi coletada (Figura 4).

Figura 4 – Mapa da localidade de coleta do espécime de *B. pubescens* na cidade de Santa Margarida do Sul, Rio Grande do Sul.



Fonte: O autor.

O veneno foi extraído através de massagem da glândula de veneno e aplicação de pressão das presas contra um béquer (Figura 5) e coletado com auxílio de uma pipeta, posteriormente foi armazenado em freezer ($- 20^{\circ}\text{C}$) até o uso.

Figura 5: Método de extração manual de veneno de serpentes realizado no Laboratório de Estudos em Biodiversidade Pampiana (LEBIP) da Fundação Universidade Federal do Pampa. Na imagem pode-se observar a realização da massagem nas glândulas de veneno e a pressão contrária exercida pelo béquero nas presas para a saída do veneno. (Foto de Darlene Rangel).



Fonte: O autor.

3.2. Manutenção de *Gallus gallus domesticus*

Para a preparação do músculo biventer cervicis usou-se 4 pintainhos por concentração de veneno (*G. gallus domesticus*) com idades entre 3 – 8 dias, de ambos os sexos, adquiridos através da Agropecuária Sinuelo LTDA situada na cidade de São Gabriel, Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em gaiolas, no biotério da Universidade Federal do Pampa, campus São Gabriel, com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz), recebendo água e ração. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética no Uso de Animais (CEUA / UNIPAMPA, Protocolo n ° 037/2012) de acordo com o Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONSEA.

3.3. Técnica miográfica

3.3.1. Preparação músculo biventer cervicis (BC) de pintainho e exposição ao veneno de *B. pubescens*

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados por via inalatória com aflotoxinas e, após o isolamento (Figura 6), o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição (mM/L): NaCl 136mM; KCl 5mM; CaCl₂ 2,5mM; NaHCO₃ 23,8mM; MgSO₄ 1,2mM; KH₂PO₄ 1,2mM e glicose 11mM. A solução foi areada de modo constante com carbogênio (mistura 95% de O₂ e 5% de CO₂), mantida a 37°C estabilizada por 30 minutos antes do uso.

A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 grama/força e foram aplicados pulsos supramáximos de até 10 V de 0,5 Hz de frequência e 0,2 ms. As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximos e as contraturas em resposta à adição de ACh (120 µM) e KCl (40 mM) foram realizados na ausência de estimulação elétrica e registrado em fisiógrafo, por meio de transdutores isométricos. Os registros das contraturas para KCl e ACh foram realizados no início do experimento (antes da adição do veneno) e no final do experimento (após 120 minutos de incubação com a toxina). Seis a oito lavagens foram efetuadas sempre após a adição de KCl e de ACh. Após 5 minutos de estabilização no banho de órgãos, o músculo foi exposto ao veneno de *B. pubescens* nas concentrações de 70, 140 e 280 µg/mL. O controle foi realizado somente com a solução Krebs.

Figura 6 – Fotografia da preparação do músculo biventer cervicis de pintainho (*G. gallus domesticus*) para posterior exposição ao veneno de *B. pubescens* em banho de órgão isolado.



Fonte: O autor.

3.3.2. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A significância das diferenças foi determinada pelo teste ANOVA, com $p < 0,05$ considerado significativo. Para a criação dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 7.

3.4. Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Para a análise eletroforética foi realizada uma dosagem proteica através do aparelho NanoVue Plus (GE Health Care), utilizando um comprimento de onda de 280 nm.

A amostra de veneno foi submetida à SDS – PAGE 15%, seguindo o protocolo de Laemmli (1970), onde 17 μ g de proteína do pool total do veneno foram desnaturados em tampão de amostra (água deionizada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 0,5%), sob fervura durante 5 minutos. As proteínas foram separadas por eletroforese a 100 v e posteriormente coradas com Comassie Blue R250.

3.5. Comparação de perfis eletroforéticos de venenos botrópicos

Para as comparações dos venenos de serpentes botrópicas utilizou-se perfis eletroforéticos já elucidados na literatura. Para as comparações eletroforéticas foram utilizados os trabalhos realizados por Baptista (2016) comparando o perfil

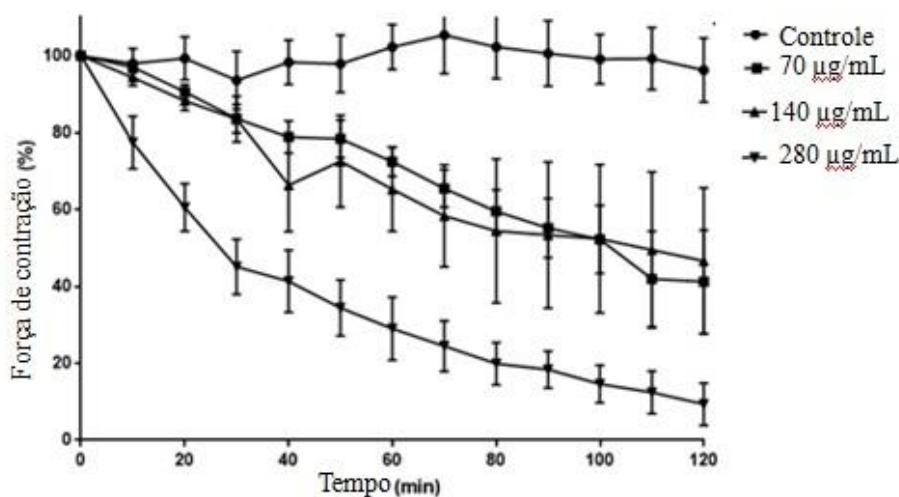
eletroforético do veneno de espécies de *B. jararaca* nascidas em cativeiro com as utilizadas para a fabricação do soro antibotrópico; o estudo que compara proteínas de venenos botrópicos realizado por Debono (2016); o estudo de Sousa *et al* (2013) também foi comparado com os demais perfis no presente trabalho. O trabalho de Oliveira (2016) que estuda o proteoma das glândulas de veneno de *B. jararaca* em diferentes estágios de desenvolvimento (adultas e recém nascidas) e também de diferentes sexos também foi utilizado no presente estudo.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do veneno de *B. pubescens* sobre a junção neuromuscular em preparação biventer cervicis de pintainho

Nas preparações de controle não houve mudanças significativas na amplitude das contrações musculares em resposta a estimulação indireta e as contraturas de ACh e KCl também se mantiveram estáveis (Figura 7). O veneno de *B. pubescens* nas concentrações de 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$ produziu inibição progressiva e reversível por lavagem e na concentração de 280 $\mu\text{g/mL}$ houve bloqueio total e irreversível das contrações musculares. A força de contração diminuiu diretamente proporcional a concentração de veneno utilizada e o tempo de exposição do músculo ao veneno com inibições de 80, 60 e 40% nos tempos de 40, 60 e 110 minutos, respectivamente para a concentração de 70 $\mu\text{g/mL}$; inibições de aproximadamente 85, 60 e 40% em 20, 40 e 120 minutos na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$; e de 80, 20 e praticamente 100% em 20, 80 e 120 minutos, respectivamente, de bloqueio da força de contração na concentração de 280 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7).

Figura 7 – Efeito das concentrações de 70, 140 e 280 $\mu\text{g/mL}$ do veneno de *B. pubescens* em preparação de músculo biventer cervicis de pintainho a 37°C. O gráfico mostra a curva de resposta à concentração-tempo para atividade de bloqueio neuromuscular do veneno em comparação ao controle.

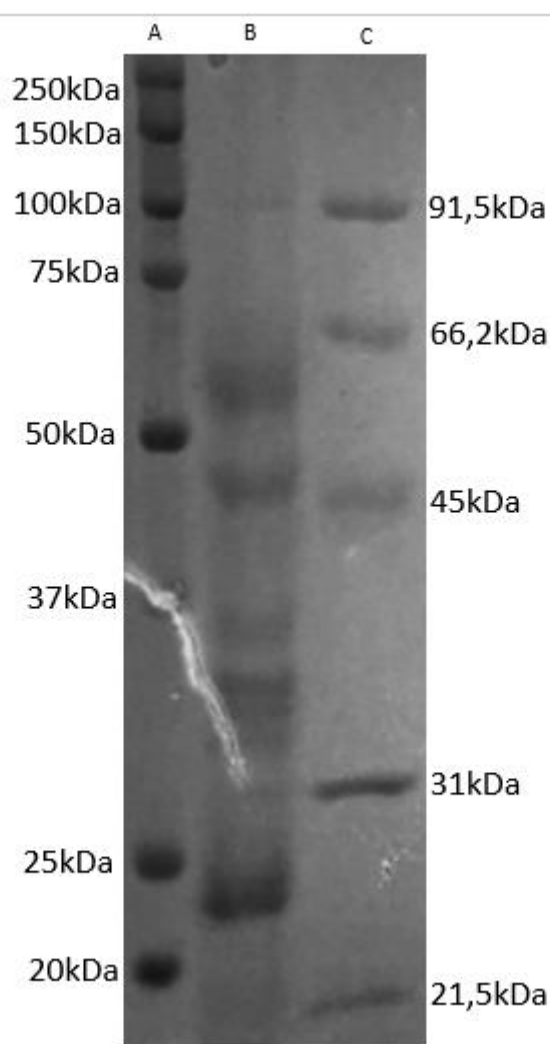


Fonte: O autor.

4.2. Perfil eletroforético do veneno da serpente *B. pubescens*

O veneno de *B. pubescens* mostrou um perfil eletroforético com um total de 8 bandas proteicas onde foi possível observar bandas entre 23 a 100 kDa (Figura 8). As bandas de 23 kDa foram proeminentes no gel. Na análise do gel também foi possível identificar as regiões características das principais famílias de proteínas encontradas nos venenos de serpentes botrópicas, tais como fosfolipases A₂, serinoproteases e metaloproteínas.

Figura 8 – Perfil eletroforético do veneno de *B. pubescens*. (A) marcador de massa molecular Precision Plus Protein Kaleidoscop Prestained Protein Standards da BioRad; (B) veneno de *B. pubescens*; (C) marcador de massa molecular SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range da Bio-Rad.



Fonte: O autor

4.3. Comparação do perfil proteico do veneno de *B. pubescens* com serpentes do gênero *Bothrops*

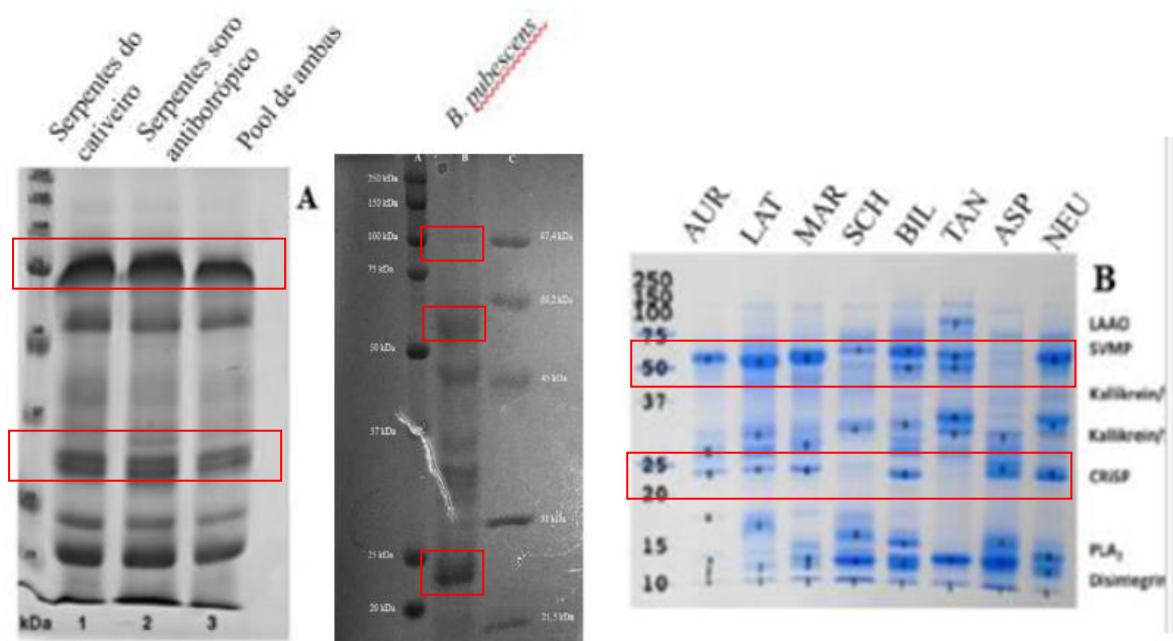
A variabilidade do veneno entre as serpentes botrópicas já foi elucidada em diversos estudos. Um trabalho realizado por Baptista (2016) (Figura 9A) comparando o perfil eletroforético do veneno de espécies de *B. jararaca* nascidas em cativeiro com as utilizadas para a fabricação do soro antibotrópico mostrou bandas proteicas em 20, 22, 30 e 50 kDa semelhantes com as encontradas no gel de *B. pubescens* (Figura 9E), porém, a banda proteica na altura de 45 kDa se mostrou muito mais intensa no gel do veneno de *B. pubescens* quando comparado com o perfil de *B. jararaca* e a banda de 75 kDa, presente tanto nas serpentes do cativeiro quanto as serpentes utilizadas para a produção de soro não foi encontrada no gel de *B. pubescens* (Figura 9E).

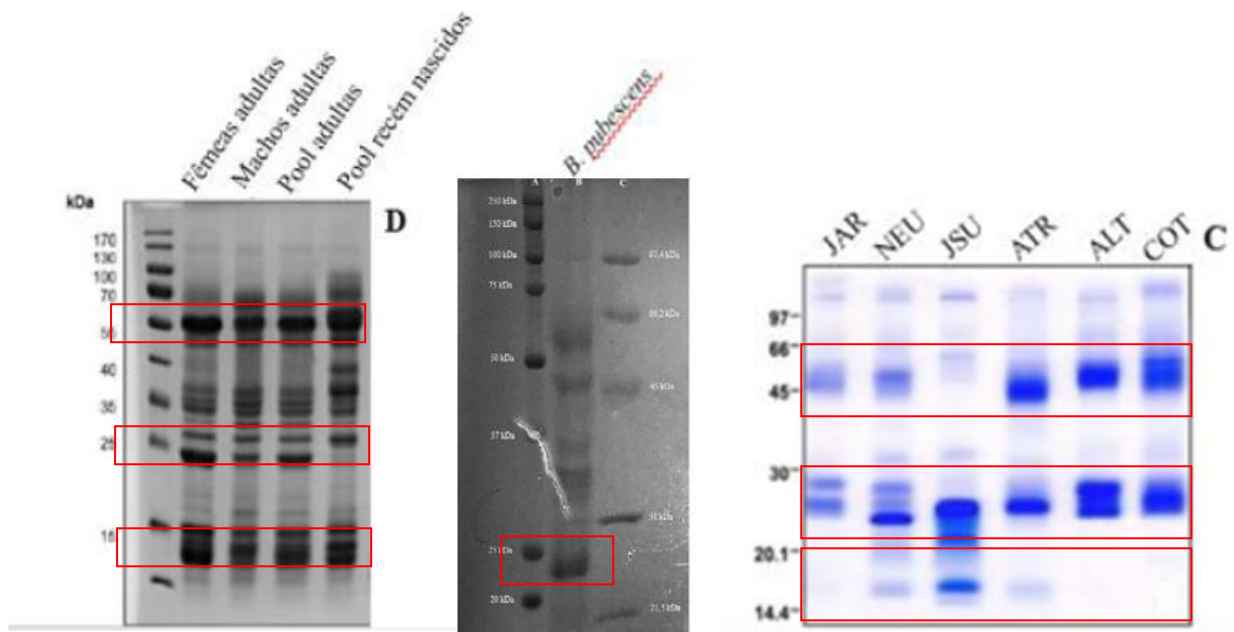
Outro estudo que compara e caracteriza proteínas de venenos botrópicos através da desnaturização de proteínas foi realizado por Debono (2016) (Figura 9B). Bandas na região de 75 kDa, provavelmente LAAO's, não estão presentes na composição do veneno de *B. aurifer*, *B. lateralis*, *B. marchi*, *B. neuwiedi bolivianus* e em *B. pubescens* (Figura 9E). Porém, quando olhamos para os spots de *B. taeniata* podemos observar a presença de uma banda proteica nesta massa molecular e, com mais intensidade do que a presente no perfil de *B. bilineata*, indicando a menor quantidade dessas mesmas proteínas. Quando olhamos para massa molecular de 50 kDa, possivelmente SVMP de classe PIII, que normalmente se encontram entre 48 – 60 kDa, percebemos a alta intensidade de bandas em *B. lateralis*, *B. marchi*, *B. neuwiedi bolivianus*, no entanto esta banda não está presente em *B. asper*, *B. schlegelli* e nem em *B. pubescens* que era considerada uma subespécie do complexo *neuwiedi* assim como *B. neuwiedi bolivianus*. A banda de 23 kDa presente intensamente no perfil de *B. pubescens* também se encontra em *B. asper*, porém, não é possível observar esta banda em *B. schlegelli* e nem em *B. taeniata*.

Sousa *et al* (2013) (Figura 9C) demonstra que a região correspondente a bandas de aproximadamente 50 kDa, foi menos intensa na eletroforese de veneno de *B. jararacussu* do que outras, incluindo *B. pubescens*, serpente do presente estudo. Além disso, outras diferenças proteicas é possível de ser observadas como a banda de massa molecular de, aproximadamente, 30 kDa presentes intensamente em *B. jararacussu* e *B. alternatus* diferentemente de *B. jararaca* e *B. pubescens* que não a possuem.

No trabalho de Olveira (2016) (Figura 9D) que estuda o proteoma das glândulas de veneno de *B. jararaca* em diferentes estágios de desenvolvimento (adultas e recém nascidas) e também de diferentes sexos foi possível observar um perfil proteico bem mais complexo quando comparado com o de *B. pubescens* (Figura 9E), com um maior número de bandas e mais intensas. Contudo, esta diferença de intensidade também é observada em nível de desenvolvimento e sexo diferentes dentro da mesma espécie. Fêmeas possuem bandas proteicas bem mais intensas que os machos, sugerindo que produzem uma maior quantidade de proteínas de interesse quando pensamos em venenos de serpentes. O pool de veneno de exemplares recém nascidos possui uma alta intensidade na banda de 55 kDa, mais intensa inclusive que a existente na fêmea adulta, o que possivelmente significa que serpentes recém nascidas tenham uma maior quantidade de metaloproteinases de classe PIII que as adultas.

Figura 9 – Comparação do perfil eletroforético do veneno de serpentes botrópicas. (A) Veneno de *B. jararaca*, canaleta 1 serpentes do cativeiro; canaleta 2 serpentes utilizadas para fabricação do soro antitotrópico e canaleta 3 mistura das duas peçonhas; (B) = canaleta 1 (AUR) *B. aurifer*; canaleta 2 (LAT) *B. lateralis*; canaleta 3 (MAR) *B. marchi*; canaleta 4 (SCH) *B. schlegelli*; canaleta 5 (BIL) *B. bilineata*; canaleta 6 (TAN) *B. taeniata*; canaleta 7 (ASP) *B. asper*; canaleta 9 (NEU) *B. neuwiedi bolivianu*; (C) = canaleta 1 (JAR) *B. jararaca*; canaleta 2 (NEU) *B. neuwiedi*; canaleta 3 (ATR) *B. atrox*; canaleta 4 (JSU) *B. jararacuçu*; canaleta 5 (ALT) *R. alternatus*; canaleta 6 (COT) *R. cotiara*; (D) = venenos de *B. jararaca* em diferentes estágios de desenvolvimento; canaleta 1 fêmeas adultas; canaleta 2 machos adultos; canaleta 3 pool de veneno de serpentes adultas; canaleta 4 pool de veneno de serpentes recém nascidas.





Fonte: Baptista (2016); Sousa (2013); Debono (2016); Oliveira (2016); Abreu (2018).

5. DISCUSSÃO

O veneno de serpentes do gênero *Bothrops* é conhecido por produzir hemorragia, edema e mionecrose no local da inoculação do veneno (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003), além de mostrar atividade neurotóxica *in vitro* em várias espécies de serpentes do gênero: *B.jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983, HELUANY *et al.*, 1992), *B.moojeni* (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1990), *B.insularis* (COGO *et al.*, 1993, 1998; RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 2004), *B.pirajai* (COSTA *et al.*, 1999), *B.lanceolatus* (LÔBO-ARAÚJO *et al.*, 2002), *B.leucurus* (PRIANTI *et al.*, 2003), *B.pauloensis* (BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2003, RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 2004), *B.erythromelas* (ZAMUNÉR, *et al.*, 2004), *B.neuwiedi goyazensis*, *B.neuwiedi paranaensis* e *B.neuwiedi diporus* (ABREU *et al.*, 2007). Harvey *et al.*, (1994) considera a preparação de biventer cervicis de pintainho um importante instrumento para estimar a toxicidade de venenos de serpentes devido às áreas quimiossensíveis ao longo de toda a fibra muscular, que respondem com contratura à agonistas colinérgicos, como a ACh, e substâncias despolarizantes, como o KCl, adicionados ao banho para contato com o músculo.

Um dos principais alvos de venenos de serpente é o sistema nervoso somático, especialmente a junção neuromuscular, uma vez que há inibição da neurotransmissão na JNM o resultado é paralisia dos músculos respiratórios e a morte (HODGSON; WICKRAMARATNA, 2002). Em geral as neurotoxinas podem causar paralisia muscular, atuando na junção pré-sináptica impedindo a liberação de ACh ou pós-sináptica bloqueando os receptores nicotínicos (VITAL BRASIL, 1982).

Como observado neste trabalho, o veneno de *B.pubescens* causou bloqueio neuromuscular parcial e reversível nas concentrações de 70 e 140 µg/mL e total e irreversível na concentração mais alta, de 280 µg/mL em preparações de biventer cervicis de pintainhos, semelhante a outros venenos botrópicos (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983; COGO *et al.*, 1993; LÔBO-ARAÚJO *et al.*, 2002; BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; PRIANTI *et al.*, 2003; ABREU *et al.*, 2007). Quando comparamos outros ensaios neurotoxicológicos de espécies de *Bothrops* observamos as diferenças na toxicidade dos venenos de serpentes do mesmo gênero, *B.pauloensis*, por exemplo, nas concentrações de 5 – 20 µg/mL causaram bloqueio total e irreversível em 120 minutos e na concentração de 100 µg/mL causou bloqueio total da força de

contratura em apenas 40 minutos de exposição (SOARES *et al.*; 2000); o veneno de *B.leucurus* nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL causou bloqueio parcial na contratura de força de biventer cervicis de pintainho de 80 e 40%, respectivamente (PRIANTI JR *et al.*; 2003); *B. alcatraz*, na concentração de 5 µg/mL, não causou nenhum tipo de dano da força de contratura do músculo biventer cervicis, porém na concentração de 50 µg/mL levou apenas 80 minutos de exposição para a inibição total da contração muscular e com 100 µg/mL pouco mais de 40 minutos foi o suficiente para a inibição total (MORAES *et al.*; 2011).

Diferenças tão exorbitantes nas respostas a exposição do veneno corroboram com as diferenças na composição proteica do veneno botrópico. Gallaci e Cavalcante (2007) descreveram proteínas como fosfolipases A2 (PLA2s e LYS49), do veneno de *Bothrops* entre as responsáveis por bloquear a transmissão neuromuscular em preparações isoladas de camundongos ou pintainhos (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Fosfolipases tem baixo peso molecular, em torno de 14kDa e quando observamos perfis proteicos de serpentes botrópicas vemos a diferença de intensidade como em *B.aurifer*, que possui esta banda com muito menos intensidade quando comparada a *B.schlegelli* (DEBONO *et al.*; 2016).

A peçonha de serpentes consiste em uma complexa gama de proteínas, peptídeos, lipídeos, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas. Contudo, as proteínas estão presentes majoritariamente na constituição do veneno, chegando a ser responsável por cerca de 90 – 95% do peso seco do veneno (CHIPAUX, WILLAMS; WHITE, 1991). Os componentes proteicos incluem uma enorme variedade de substâncias farmacologicamente ativas e com propriedades distintas que atuam na indução de alterações fisiopatológicas locais e sistêmicas, consequentes do envenenamento (CARDOSO *et al.*; 2010; GOMES *et al.*; 2011). Em geral, os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* apresentam, de forma predominante, proteínas com massa molecular entre 14- 64 kDa, quando em condições redutoras, sendo observadas algumas diferenças em relação ao número e intensidade das bandas proteicas (QUEIROZ *et al.*, 2008). Estudos vêm demonstrando que bandas proteicas nos venenos de serpentes *Bothrops* em torno de 50 kDa correspondem a metaloproteínases da classe PIII; entre 20 - 37 kDa, a serinoproteases e metaloproteínases da classe PI; e 10 – 15 kDa, a fosfolipases A2 (Kohlhoff *et al.*, 2012). O estudo da composição proteica do veneno da peçonha e seus efeitos sobre o organismo apresentam um papel fundamental

na compreensão do envenenamento e mecanismos de ação responsáveis por este, assim como a investigação de seu potencial terapêutico (CINTRA *et al.*; 2012; KAMIGUTI *et al.*; 1996).

Os venenos de viperídeos possuem grandes quantidades de SVMP, que estão sendo extensivamente estudadas e consideradas toxinas fundamentais para o desenvolvimento de lesões, pois, estão presentes em diversos processos do envenenamento, como: degradação dos fatores de coagulação sanguínea, inibição da agregação plaquetária, edema, degradação dos componentes da matriz extracelular e atividade hemorrágica (GUTIÉRREZ *et al.*; 2005). As SVMPs classe P-I e P-III contêm o domínio catalítico funcional semelhante ao das metaloproteínases de matriz extracelular de mamíferos (MMPs), com regiões homólogas como o motivo de ligação ao zinco (BODE *et al.*; 1993).

Sousa (2013) afirma que há falta de semelhança na composição de proteínas entre serpentes intimamente relacionadas e, uma similaridade entre os venenos de serpentes mais distantes filogeneticamente, o que sugere a pouca conexão entre posição taxonômica e a composição do veneno. Quando observamos outros estudos, bandas de 50 a 60 kDa, que indicam metaloproteínases de classe P3, não foram encontradas em espécies como *B.aurifer*, *B.lateralis*, *B.marchi* e se apresentou em maior quantidade que em *B.bilineata* e *B.schlegelli*. (FERNANDES *et al.*, 2014). A presença de bandas que possivelmente correspondam a metaloproteínases sugere que o veneno tenha ações tais como indução de hemorragia local, reação inflamatória, ativação de fatores de coagulação e inibição da agregação plaquetária o que corrobora com os quadros clínicos descritos por vítimas de acidentes botrópicos (SOUSA *et al.*, 2013). Terra e De Lema (2006) sugerem que dentre as SVMP presentes no veneno botrópico, com massas moleculares entre 48 a 60 kDa é onde são encontradas as proteínas hemorrágicas, como por exemplo a bothropasina, isolada pelo grupo de Mandelbaum, Reichel e Assakura (1982), a alternagina isolada de *B.alternatus* com massa molecular de 55kDa (SOUZA *et al.*, 2000) e a jararagina, purificada pelo grupo Paine (1992) com massa molecular de 52 kDa que promove lesão endotelial sistêmica.

Trabalhos anteriores demonstram que ocorrem variações intraespecíficas na composição dos venenos, em função da distribuição geográfica. Baptista (2016), Oliveira (2016) e Sousa (2013) estudam a mesma espécie de serpente, a *B.jararaca*,

porém de localizações geográficas diferentes. A banda de massa molecular de 75 kDa, presente intensamente no espécime estudado por Baptista criadas em cativeiro no Instituto Butantan não é encontrada no espécime analisado por Sousa coletada em Tapajós, Paraná e é observada com mais intensidade em exemplares machos dos espécimes estudados por Oliveira, localizadas no estado de São Paulo.

Essas variações bioquímicas e farmacológicas mostram diferenças significativas em algumas propriedades, tais como letalidade, atividade enzimática, efeitos locais e padrões eletroforéticos. A singularidade observada no veneno de *B.pubescens* pode ocorrer devido ao seu habitat restrito a região do Pampa e Uruguai e também pode haver variação na composição proteica do veneno interespecie devido à variação do tipo de dieta adotada por cada indivíduo. A banda de 23 kDa presente no perfil eletroforético do veneno de *B.pubescens* não foi observada em *B.neuwiedi*, espécie a qual *B.pubescens* era enquadrada, nem em *B.atrox*, *B.alternatus*, *B.cotiara*, *B.aurifer*, *B.schlegelli*, *B.taeniata*, e nem em *B.jararaca* coletada na região de Tapajós, contudo, a mesma banda proteica é encontrada em *B.jararaca* mantida em cativeiro no Instituto Butantan e também nas fêmeas adultas de *B.jararaca* do estado de São Paulo e estão presentes com pouca intensidade nos machos adultos e ausentes no veneno de espécimes recém nascidos. A composição do veneno de uma serpente depende de diversos fatores intrínsecos como fatores ontogenéticos, variação sexual e extrínsecos como habitat e alimentação e isso está intimamente ligado a esta variação proteica na composição dos venenos botrópicos. Essas diferenças nas peçonhas podem causar respostas diferentes em um acidente ofídico e, quando analisadas eletroforeticamente as amostras variam muito dentro do mesmo gênero e inclusive dentro da mesma espécie.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra que o veneno da serpente *B.pubescens*, em altas concentrações, é capaz de causar bloqueio neuromuscular total e irreversível quando testado em preparações isoladas de ave e, mesmo em concentrações reduzidas, leva a um bloqueio parcial e reversível, reforçando a toxicidade deste para o sistema nervoso somático. Além disso, a identificação de proteínas como metaloproteinases indicam atividade hemorrágica e outros efeitos causados pelo veneno desta espécie, sendo um passo inicial para a caracterização e entendimento do modo de ação deste, o que, posteriormente, deve viabilizar sua inserção no preparo do soro antitoxico e também a prospecção de novas biomoléculas de interesse biotecnológico.

Como perspectivas têm-se a caracterização do veneno da serpente *B.pubescens* em miotóxico e/ou neurotóxico, bem como a caracterização do veneno através de técnicas proteômicas.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU A.V.; DAL BELO C.A.; HERNANDES-OLIVEIRA S.S.; BORJA-OLIVEIRA C.R.; HYSLOP S.; D.FURTADO M.F.; RODRIGUES-SIMIONI L. **Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*)**. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. vol 148, Issue 1. p 142-149. 2007;
- ALAPE-GIRO, A.; SANZ, L.; FLORES-DI, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. J.; RICA, C. **Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper* : Geographic , Individual , and Ontogenetic Variations**. *Journal of Proteome Research*, v. 7, p. 3556–3571, 2008;
- ALENCAR, L.R.V. **Diversificação de espécies e da morfologia em serpentes da família Viperidae: padrões e processos**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Biociências São Paulo. 2016;
- ALMEIDA, M. T.; M. MARTINS. **História natural de *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae)**. In: V Congresso Latinoamericano de Herpetologia, Montevideo. p.26. 1999;
- ALVES, R.M. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox***. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 2007;
- AMARAL C.F.; DE REZENDE N.A.; DA SILVA O.A.; RIBEIRO M.M.; MAGALHÃES R.A.; DOS REIS R.J. **A cute kidney failure and ophidian bothropic and crotalid accidents. Analysis of 63 cases**. *Ver In st Med Trop São Paulo*; 28(4): 220-7. 1986;
- Antunes T.C.; Yamashita T.M.; Barbaro K.C.; Saiki M.; Santoro M.L. **Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms**. *Toxicon*. vol 56 n. 8. p. 1443-1458. 2010;
- ARAÚJO F.A.A.; SANTALÚCIA M.; CABRAL R.F. **Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos**. In Cardoso J.L.C., França O.S.F., Wen F.H., Málaque C.M.S., Haddad Jr. V. (orgs). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003;
- Banco Internacional de Objetos Educacionais. Disponível em: <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/6594>. Acesso em 18 out de 2018;
- BAPTISTA I. **Estudo comparativo do veneno botrópico de referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan**. Instituto Butantan. São Paulo. 2016;
- BARRAVIERA B.; PEREIRA P.C.M.; **Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops***. In Barraviera B. *Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos*. Rio de Janeiro: EPUB. p. 261-280. 1999;
- BÉRNILS, R. S. **Brazilian reptiles – List of species**. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2010. Acessado em 27 de jun de 2018;
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels**. *Electrophoresis* 8, 93–99. 1987;

- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F.; STOCKER, W. **Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins.** FESBS Lett., v. 331, p. 134–140, 1993;
- BORJA-OLIVEIRA C.R., DURIGON A.M., VALLIN A.C.C., TOYAMA M.H., SOUCCAR C., MARANGONI S., RODRIGUES-SIMIONI L. **The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission.** Braz. J. Med. Biol. Res. p. 617-624. 2003;
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Fundação nacional da Saúde, 1998;
- BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** 2º ed. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001;
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere.** V.2. New York: Cornell University, p. 870. 2004;
- CARDOSO K.C.; SILVA M.J.; COSTA G.G.L.; TORRES T.T.; DEL BEM L.E.; VIDAL R.O.; MENOSSI M.; HYSLOP S. **A transcriptome analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu).** BMC Genomics. vol 11. p. 605. 2010;
- CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. **Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae).** Zoologica Scripta, vol 41, p. 109-124, 2012;
- CAVALCANTE, W. L.; HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; GALBIATTI, C.; RANDAZZOMOURA, P.; ROCHA, T.; PONCE-SOTO, L.; MARANGONI, S.; PAI-SILVA, M. D.; GALLACCI, M.; DA CRUZ-HÖFLING, M. a; RODRIGUES-SIMIONI, L. **Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom.** Journal of venom research, v. 2, n. October, p. 37–41, 2011;
- CAVALCANTE, W.L.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. **Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation.** J. Ethnopharmacol., v.112, p.490-497, 2007;
- CECHIN, S. Z. **História natural de uma comunidade de serpentes na região da Depressão Central (Santa Maria), Rio Grande do Sul, Brasil.** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, 1999;
- CHIPAUXX J.P. **Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease.** Venomous Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 23 (1) 2017;
- CHIPAUXX J.P., WILLIAMS V. e WHITE J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation.** Toxicon; 29 (11):1279-303. 1991;
- CHIPAUXX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation.** Toxicon, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991;
- CINTRA A.C.; DE TONI L.G.; SARTIM M.A.; FRANCO J.J.; CAETANO R.C.; MURAKAMI M.T.; SAMPAIO S.V. **Batroxase a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity.** Toxicon. vol 60 n 1. p. 70-82. 2012;

- COGO J.C., PRADO-FRANCESCHI J., CRUZ-HOFLING M.A., CORRADO A.P., RODRIGUES-SIMIONI L. **Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse nerve-muscle preparation.** *Toxicon*; 31:1237-1247. 1993;
- COGO J.C., PRADO-FRANCESCHI J., GIGLIO J.R., CORRADO A.P., CRUZ-HÖFLING M.A., DONATO J.L., LEITE J.B., RODRIGUES-SIMIONI L. **An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A2.** *Toxicon*; 36:1323-1332. 1998;
- COSTA P.D., TOYAMA M.H., MARANGONI S., RODRIGUES-SIMIONI L., CRUZ-HÖFLING M.A. **Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation.** *Toxicon*. 37:1143-1153. 1999;
- COSTA, H. C.; BERNILS, R. S. **Répteis brasileiros: lista de espécies.** *Herpetologia Brasileira*, v. 3, p.74 – 84, 2014;
- COSTA, H.; BERNILS, R. **Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies.** *Herpetologia Brasileira*. p. 11-57. 2018;
- CUPO P., AZEVEDO M.M., HERING S.E. **Acidentes Ofídicos: Análise de 102 casos.** Livro de Resumos do XXI Congresso da Soc Bras Med Trop; 23-24. 1990;
- DALLEGRAVE E.; SEBEN V.C. **Toxicologia Clínica: aspectos teórico-práticos.** In GONZÁLEZ F.H.D.; SILVA S.C. *Patologia Clínica Veterinária: texto introdutório.* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 145-210. 2008;
- DALTRY J.C.; WUSTER W.; THORPE R.S. **Diet and snake venom evolution.** *Nature*. vol 379 n. 6565. p. 537-540. 1996;
- DEBONO J.; COCHRAN C.; KURUPPU S.; NOUWENS A.; RAJAPAKSE N.W.; KAWASAKI M.; WOOD K.; DOBSON J.; BAUMANN K.; JOUIAEI M.; JACKSON T.N.W.; KOLUDAROV I.; LOW D.; ALI S.A.; SMITH A.I.; BARNES A.; FRY B.G. **Canopy Venom: Proteomic Comparison among New World Arboreal Pit-Viper Venoms.** *Toxicon*. vol 8. 2016;
- ELLMANN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V., FEATHERSTON R.M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacologic*, 88-95, 1961;
- Exóticas e poderosas: assim são as cobras. Disponível em: <http://petsebichosbr.blogspot.com/2013/01/exoticas-e-poderosas-assim-sao-as-cobras.html>. Acesso em 18 out de 2018;
- F. L. **Origem e diversidade das serpentes.** *Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. p. 13-32. 2003;
- FAN HW, FRANÇA FOS. **Acidente elapídico.** In: Schvartsman S, ed. *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. São Paulo: Sarvier. p. 167-790. 1992;
- FERNANDES, C. T.; GIARETTA, V. M.; PRUDENCIO, L. S.; TOLEDO, E. O.; DA SILVA FERREIRA S.R., DAL BELO C.A., HÖFLING M.A.C., HYSLOP S., SIMIONI L.R. **Presynaptic effect of a methanolic extract of toad (*Rhinella schneideri*) poison in avian neuromuscular preparation.** *J Venom Res.*, 32-36, 2011;
- FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; JR, V. H. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica.** 2 ed. São Paulo: SARVIER, 2009.

FRY, B.G.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S.F.R.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S.B. RICHARDSON, M.K.; HODGSON, W.C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. **Early evolution of the venom system in lizards and snakes**. *Nature*, v. 439, p. 584 – 588, 2005;

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine**. *Nature* v. 288, p. 373-376. 1980;

GINSBORG BL.; WARRINER JN. **The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation**. *Br. J. Pharmacol.*, 410–411, 1960;

GOME M.S.R.; DE QUEIROZ M.R.; MAMEDE C.C.N.; MENDES M.M.; HAMAGUCHI A.; HOMSI-BRANDEBURGO M.I.; SOUSA M.V.; AQUINO E.N.; CASTRO M.S.; OLIVEIRA F.; RODRIGUES V.M. **Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (*BleucMP*) from *Bothrops leucurus* snake venom**. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*. vol 153 n.3. p. 290-300. 2011;

GOMES, M. S. R. **Caracterização estrutural e funcional de metaloproteases isoladas de peçonhas botrópicas**. Tese de doutorado. 2013;

GUTIÉRREZ J.M., CHAVEZ F., GENÉ J.A., LOMONTE B., CAMACHO Z., SCHOSINSKY K. **Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jump ingviper) from Costa Rica**. *Toxicon*; 27(7): 735-45. 1989;

GUTIÉRREZ J.M., LOMONTE B. **Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms**. *Toxicon*; 33(11):1405-24. 1995;

GUTIÉRREZ J.M.; LOMONTE_B. **Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms**. *Toxicon*. 33(11) p. 1405-24. 1995;

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. **Trends in snake bite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations**. *Curr. Pharm. Des.*,v. 13, p. 2935-2950, 2007;

HARVEY A.L.; BARFARAZ A.; THOMSON E.; FAIZ A.; PRESTON S.; HARRIS J.B. **Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks**. *Toxicon*, 32(3):257-65. 1994;

HELUANY N.F., HOMSI-BRANDEBURGO M.L., GIGLIO J.R., PRADO-FRANCESCHI J., RODRIGUESSIMIONI L. **Effects induced by *Bothrops* toxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom on mouse and chick muscle preparations**. *Toxicon*; 30:1203-1210. 1992;

HIDER R.C., KARLSSON, E. E., NAMIRANIAN, S. **Separation and purification of toxins from snake venoms**. In: *Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics* Pergamon Press. Ed. Harvey AL, Elsevier, UK, p.1-34. 1991;

HODGSON W.C.; WICKRAMARATNA J.C.; **In vitro neuromuscular activity of snake venoms**. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. vol 9. p.807-14. 2002;

HOFMANN H., BON C. **Blood coagulation induced by venom of *Bothrops atrox*: Identification, purification and properties of two factor activators**. *Biochemistry*; 26(3): 780-7. 1987;

- HUGHES BW., KUSNER L.L., KAMINSKI H.J. **Molecular architecture of the neuromuscular junction.** *Muscle&Nerve*, 445-461, 2006;
- I. R.; COLLACO, R. C.; BARBOSA, A. M.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; COGO, J. C. **Neuromuscular activity of *Bothrops fonsecai* snake venom in vertebrate preparations.** *J Venom Res*, v. 5, p. 6–15, 2014;
- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. **Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 74-76. 1997;
- KAMIGUTI A.S.; HAY C.R.; THEAKSTON R.D.; ZUZEL M. **Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases.** *Toxicon*. vol 34 n. 6. p. 627-642. 1996;
- KARLSSON, E.; LEE, C. Y. **Snake venom.** In: Lee, C. *Handbook of experimental pharmacology*. V. 52, p. 32, 1979;
- KOUYOUMDJIAN J.A., POLIZELLI C., LOBO S.M., GUIMARÃES S.M. **Fatal extraduralhaematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*).** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(4): 552. 1991;
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LÔBO DE ARAÚJO A., DONATO J.L., LEITE G.B., PRADO-FRANCESCHI J., FONTANA M.D., BOM C., RODRIGUES-SIMIONI L. **Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom and a caseinolytic fraction.** *Toxicon* 40:1283-1289. 2002;
- LOMONTE, B.; GUITIÉRREZ, J. M. **A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo).** *Toxicon*, v. 27, p. 725 – 733, 1989;
- LÓPEZ-LOZANO JL, DE SOUSA MV, RICART CA, CHÁVEZ-OLORTEGUI C, FLORES SANCHEZ E, MUNIZ EG, BÜHRNHEIM PF, MORHY L. **Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest.** *Toxicon*. vol 40 n. 7. p. 997-1006. 2002;
- MANDELBAUM F.R.; REICHEL A.P.; ASSAKURA M.T.; **Isolation and characterization of proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca).** *Toxicon*. vol 20 n. 6. p. 955-972, 1982;
- MANDELBAUN FR, ASSAKURA MT, REICHL AP. **Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops newiedi* (jararaca pintada).** *Toxicon*, 22(2): 193-2006. 1984.
- MELGAREJO A.R. **Serpentes peçonhentas do Brasil.** In Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Málaque C.M.S. & Haddad Jr V. (Eds), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier Editora, São Paulo. p.42-69. 2009;
- MENEZES M.C. **Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings.** *Toxicon*. vol 47 n. 3. p. 304-312. 2006;
- MORAES D.S.; ABREU V.A.; FERREIRA S.R.; LEITE G.B.; CRUZ-HÖFLING M.A.; TRAVAGLIA-CARDOSO S.R.; HYSLOP S.; RODRIGUES-SIMIONI L.

Neuromuscular activity of Bothrops alcatraz snake venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon*. Vol 59. p. 294 – 299. 2011;

MURARI, S. K.; FREY, F. J.; FREY, B. M.; GOWDA, T. V.; VISHWANATH, B. S. Use of *Pavo cristatus* feather extract for the better management of snake bites: neutralization of inflammatory reactions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 229-237, 2005;

NACHIMUTHU S., PONNUSAMY R., in **Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics, 2011.** Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/book/9781907568107>. Acesso em 24 de jun 2018;

NÉR S.R., CRUZ-HÖFLING M.A., CORRADO A.P., HYSLOP S., RODRIGUES-SIMIONI L. **Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venom and their neutralization by commercial antivenom.** *Toxicon*. 44:259-271. 2002;

OGUIURA, N; FERRAREZZI, H; BATISTIC, R.F. **Cytogenetics and molecular data in snakes: a phylogenetic approach.** *Cytogenetic and Genome Research*, v. 127, p. 128 – 142, 2010;

OLIVEIRA, F. N.; BRITO M. T.; MORAIS I. C.; OLIVEIRA de F.; SAYONARA M. L.; ALBUQUERQUE, H. N. **Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(6), 662-667. 2010;

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. **Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos.** In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; JR, V.H. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica.* 2 ed. São Paulo: SARVIER, 2009;

PAINÉ M.J.L.; **Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family.** *Journal of Biological Chemistry* . vol 267 n 32. p. 22869-22876. 1992;

PRIANTI J.R., RIBEIRO W., LOPES-MARTINS R.A.B., LIRA-DA-SILVA R.M., PRADO FRANCESCHI J., RODRIGUES-SIMIONI L., CRUZ-HÖFLING M.A., LEITE G.B., HYSLOP S., COGO J.C. **Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick Biventer cervicis preparations.** *Toxicon* 41: 595-603. 2003;

QUEIROZ L.S.; SANTO NETO H.; ASSAKURA M.T.; REICHL A.P.; MANDELBAUM F.R. **Phatological changes in muscle caused by harmorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom.** *Toxicon*. vol 23 n. 2. p. 341-345. 2009;

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F.; TAMBOURGI, D. V. **Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus.** *Toxicon*, v. 52, p. 842-851, 2008;

RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., **Review: Snake venom metalloproteases structure and function of catalytic and disintegrin domains.** *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 328 – 346. 2006;

RANG & DALE'S PHARMACOLOGY. **Churchill Livingstone**;- 7th Edition, 792 pages, 2007;

RODRIGUES-SIMIONI L., BORGESSE N., CECCARELLI B. **The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components of rognerve-muscle preparation.** Neuroscience. 10(2): 475-89. 1983;

RODRIGUES-SIMIONI L., COGO J.C., ASSAKURA M.T., MANDELBAUN F.R. **Muscular blocking activity of *Bothrops moojeni* venom and its active fractions.** Mem. Inst. Butantan 52:77-78; 1990;

ROSENFELD G. **Symptomatology, pathology, and treatment of snake bite in South America.** In: Bücherl W, Buckley EE. Venomous animals and their venoms. New York: Academic Press 345-384; 1971;

S.B; VIDAL, N. **Lizards, snakes and amphisbaenians (Squamata).** In: Hedges, S.B.; Kumar, S. (Eds.). The Timetree of life. New York: Oxford University, p. 383-389. 2009;

SAÚDE, Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos.** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/animais-peconhentos-serpentes>. Acesso em: 24 de jun 2018.;

SAÚDE. Ministério da Saúde. **Acidentes por serpentes – Situação epidemiológica.** Portal da saúde. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 24 de jun 2018;

SCHÄGGER, H. **SDS electrophoresis techniques.** in Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide 2nd edn. (eds. Hunte, C., von Jagow, G. & Schägger, H.) 4.85–4.103 Academic, San Diego, California, 2003;

SILVA K.R.L.M.; MARQUES M.G.B.; ROSSONI M.G.; FARIAS I.M.M.; SILVA C.A.M.; LESSA C.A.S.; DOMINGUES, D.A.M.; **A utilização da telemedicina por imagem na identificação das espécies do gênero *Bothrops*: Acidentes registrados no Centro de Informação toxicológica no Rio Grande do Sul.** In XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia. Resumos. Porto Alegre. CBTOX. 2013;

SILVA, V. X. **The *Bothrops neuwiedi* Complex.** In: Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (eds.) The venomous reptiles of the western hemisphere, New York, Cornell University Press. p. 410-421; 2004;

SINAN. **Acidente por animais peçonhentos - notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - SINAN net.** Disponível em : <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>. Acesso em: 27 Jun. 2013;

SLOWINSKI J.B., LAWSON R. **Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes.** Mol Phylogenet Evol; 24(2):194-202. 2002;

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. **Structural and functional characterization of BnSP-7 a Lys49 myotoxic phospholipase A (2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom.** Arch. Biochem. Biophys., v. 378, p. 201-209, 2000;

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-

SILVA, A. M. **Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 9, 2013;

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. In: Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 56, 2010;

TERRA A.L.C.; DE LEMA T.; **Comparação da toxicidade entre peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* presentes nas regiões sul e sudeste do Brasil (serpestes, Viperidae)**. Revista Brasileira de Toxicologia. vol 20 n. ½. p. 55-63. 2006;

UETZ, P. **The reptile database**. Karlsruhe: Research Center, 2009. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em 24 de jun. 2018;

UNDERWOOD, G. **A contribution to the classification of snakes**. Brit. Must. Nat. Hist., n.653, p. 1-179, 1967;

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Laboratório de Herpetologia. ***Bothropoides pubescens*** - LISTA DE RÉPTEIS DO RIO GRANDE DO SU. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/.../R%C3%A9p.../Bothropoides%20pubescens.htm>>. Acesso em 04 de jul de 2018;

VITAL BRASIL O. **Peçonhas**. In: CORBETT, C. E., ed. - Farmacodinâmica. 6. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 1044-1074. 1982;

WAGLER J.S.; **Serpentum Brasiliensium species novae**. In: SPIX, J (Ed) Animalia noca sive species novae. Monaco: Types Franc. Seraph. Hubshmanni. p. 1-75;

WARREL, D.L., Snake bites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management In: Campbell, J.A.; LAMAR, W.W. (Eds). **The venomous reptiles of the western Hemisphere**. New York: Coronell University, p. 709 – 761. 2004;

ZAMUNÉR S.R.; HÖFLING M. A. C.; CORRADO A.P.; HYSLOP S.; SIMIONI L.R. **Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom**. *Toxicon* vol. 44, Issue 3. p. 259-271. 2004.